Lane Medical Library
STANFORD UNIVERSITY LIBRARY
NOV 2 1928

AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BASEL
VORSTEHER: PROF. R. DOERR

DIE BEZIEHUNGEN DES HERPESVIRUS ZUM BLUT UND ZUM LIQUOR CEREBROSPINALIS

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT VON

MARGARETHA FISCHER
VON BASEL UND
VON BRIENZWILER (KT. BERN)

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1926

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Professor R. Doerr

Veröffentlicht in der „Zeitschrift für Hygiene", Bd. 107

Herpeseffloreszenzen können sich bekanntlich als *Begleiterscheinungen verschiedener physiologischer und pathologischer Zustände* oder als *Folgen aspezifischer, willkürlicher Eingriffe* entwickeln; diese Formen des Auftretens, die man im Gegensatz zum „*idiopathischen*" als „*symptomatischen*" und „*provozierten*" Herpes bezeichnet hat, gehören durchaus nicht zu den Seltenheiten, sondern zeigen eine höchst bemerkenswerte Häufigkeit, so daß wohl jeder Arzt über zahlreiche einschlägige Erfahrungen zu berichten weiß.

Um nur einige prägnantere Beispiele anzuführen, gibt es *Meningitisepidemien*, bei denen fast alle Patienten von Herpes befallen werden (*Romberg*) und 50% betrachtet *György* (Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 19) als die Regel; auch bei der *croupösen Pneumonie* wurde Herpes in hoher Frequenz (nach *Jürgensen* bis zu 40—50%) beobachtet. Genauere statistische Erhebungen über die Häufigkeit des *Herpes menstrualis* konnten wir in der uns zugänglichen Literatur nicht ausfindig machen; nach unseren persönlichen Wahrnehmungen scheint aber die Kombination von Herpes mit Menstruation bzw. mit Gravidität jedenfalls so oft vorzukommen, daß der Gedanke an eine rein zufällige Koinzidenz von vornherein abgelehnt werden muß. *Provozieren läßt sich der typische Herpesausschlag durch künstliche Infektion mit Malariaplasmodien* (*R. Weber*), namentlich aber durch *parenterale Injektionen verschiedener Substanzen*, unter denen neben Milch, kolloidalen Metallen (*Auld*) usw. in erster Linie *Präparate aus abgetöteten Bakterien* (*Strepto-, Meningo-, Pneumo- und Staphylokokken, Bact. prodigiosum, Coli- oder Typhusbacillen*) zu nennen sind (*P. L. Friedrich, Schottmüller, Culver, Petersen und Weichardt, O. Naegeli* u. a.). Wie groß der Prozentsatz der Menschen ist, bei welchen man durch Einspritzung von abgetöteten Bakterien (sog. „Bakterienvaccins") Herpes hervorrufen kann, läßt sich nicht präzis angeben, da sich die vorliegenden Daten auf *qualitativ* und *quantitativ ungleichartige* Injektionen beziehen und die Häufigkeit des auf diese Weise provozierten Herpes

a) von der *Natur der einverleibten Bakterien* (*O. Naegeli*),

b) von der *Zahl und Größe der injizierten Dosen* und

c) vielleicht auch vom *Applikationsmodus* (subcutan, intramuskulär oder intravenös)

abhängt. Sicher ist aber, daß in einzelnen Versuchserien 50 (*Culver*), in anderen (*P. L. Friedrich, Schottmüller*) sogar bis zu 100% positive Ergebnisse erzielt wurden,

und daß somit die Fähigkeit der Menschen, auf *geeignete* Eingriffe mit Herpes zu reagieren, zweifellos als sehr weit verbreitet, ihr vollständiges Fehlen dagegen als ein relativ seltenerer Fall zu betrachten ist.

In den Blasen des symptomatischen und des provozierten Herpes kann derselbe spezifische, auf Menschen und Tiere in praktisch unbegrenzter Folge übertragbare Infektionsstoff nachgewiesen werden wie in spontan entstehenden („idiopathischen") Herpeseffloreszenzen. Nimmt man an, daß dieses *einheitliche „Herpesvirus"* ein lebender, vermehrungsfähiger Mikroorganismus, ein Contagium animatum ist, so bleibt es zunächst unverständlich, warum Ansteckungen mit diesen Mikroben so oft und so prompt zustande kommen, wenn im Körper des Wirtes heterologe und voneinander ganz verschiedene, im einzelnen aber doch z. T. bestimmte Prozesse (Meningitis, Pneumonie, Menstruation, bakterielle Intoxikationen) ablaufen. Die seit *Henle*, *R. Koch* und *Pasteur* uneingeschränkt herrschende Tendenz, allen übertragbaren Krankheitsstoffen parasitären Charakter zuzuerkennen, gestattet nur eine Lösung dieses Widerspruches; sie führt unabweislich zur *Lehre von der Allgegenwart* (*Ubiquität*) *der hypothetischen Keime*, ein Ausweg, der auch bald nach der Entdeckung des Herpesvirus (*Grüter*) und nach dem erbrachten Beweis für seine Einheitlichkeit (*Löwenstein*) beschritten wurde.

Trotz ihres kurzen Bestandes hat die Ubiquitätstheorie bereits mehrfache Metamorphosen durchgemacht. Zuerst war man geneigt, eine allgemeine Verbreitung der Herpeserreger *in der Umwelt des Menschen* für möglich bzw. wahrscheinlich zu halten (*exogene Ubiquität*). *Doerr* konnte jedoch in seinem auf der 11. Tagung der Deutschen Vereinigung für Mikrobiologie gehaltenen Referat (Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. 1, Orig. 97, Beiheft) zeigen, daß das Vorkommen von Herpesvirus in der Außenwelt bisher noch nie nachzuweisen war und daß seine Eigenschaften (vor allem seine geringe Widerstandsfähigkeit gegen die verschiedensten schädigenden Einflüsse) gegen eine längere Persistenz außerhalb des menschlichen Wirtsorganismus sprechen. In der letztgenannten Beziehung enthält diese Mitteilung einige weitere experimentelle Belege, die an anderer Stelle angeführt und in ihrer Bedeutung gewürdigt werden sollen.

Die unhaltbare Behauptung der exogenen Ubiquität des Herpesvirus wurde übrigens rasch wieder verlassen und durch die Hypothese der *endogenen Ubiquität* ersetzt. Man stellte sich vor, daß die primären Herpesinfektionen nur klinisch ausheilen, daß aber die Herpeserreger nicht aus dem Körper verschwinden, sondern sich in lebendem und infektionstüchtigem Zustande erhalten. Aus den *Herpeskranken* sollen demnach so gut wie regelmäßig *Herpesträger* werden, die nicht nur die Infektionsquellen für die noch nicht durchseuchten Individuen

darstellen, sondern auch selbst einer Rückverwandlung in manifest (akut) Infizierte fähig sind. Wenn auch diese Lehre von der endogenen Ubiquität durchaus nicht alle Erscheinungen der Herpesepidemiologie zu erklären vermag (*Doerr*, l. c.), so muß doch zugegeben werden, daß sie das Verständnis für die Frequenz der herpetischen Erkrankungen und für die Pathogenese des *symptomatischen*, *provozierten* und *rezidivierenden* Herpes eröffnen würde, falls ihre Richtigkeit durch den tatsächlichen Nachweis zahlreicher Herpesträger in bestimmten, der Untersuchung unterworfenen Bevölkerungsgruppen sichergestellt werden könnte.

Da der *peribuccale Herpes* zwar nicht die einzige, jedenfalls aber die häufigste Lokalisation des spezifischen Virus repräsentiert, lag der Gedanke nahe, daß die Mundhöhle und ihre drüsigen Anhangsorgane das Milieu sein könnten, in welchem die Herpeskeime nach Ablauf der akuten Infektion fortvegetieren, daß also *der Speichel* Neuinfektionen derselben oder anderer Personen vermittelt. Es gelang in der Tat, bei vereinzelten, zur Zeit der Untersuchung herpesfreien Menschen das Virus im Speichel in aktiver Ferm nachzuweisen, sei es durch Verimpfung auf die Kaninchencornea nach *Grüter*, sei es durch subdurale Inokulationen und Erzeugung einer zweifellos herpetischen Encephalitis (*Levaditi*, *Harvier* und *Nicolau*, *Doerr* und *Schnabel*, *Isaicu* und *Telia*, *Blanc* und seine Mitarbeiter). Nach den gründlichen Nachprüfungen von *Flexner* und *Amoss* scheinen jedoch solche „Speichelausscheider" nur *sehr selten* vorzukommen; die genannten Autoren fanden den Speichel (von einer einzigen Ausnahme abgesehen) sogar dann virusfrei, wenn zur Zeit der Materialentnahme ein ausgedehnter peribuccaler Bläschenausschlag bestand. Im Basler Institut wurde in den letzten Jahren der Speichel von Personen mit rezidivierendem Lippenherpes im herpesfreien Intervall wiederholt und sorgfältig auf seine Infektiosität geprüft; doch waren die Ergebnisse, die gelegentlich von anderer Seite publiziert werden sollen, ausnahmslos *negativ*. Das aus der Epidemiologie des Herpes erfließende Postulat, daß die „Speichelausscheider" in einer gegebenen Menschenmasse *in sehr hohem Prozentsatz* zu finden sein müßten, oder mit anderen Worten, daß der Speichel zahlreicher Personen, der Speichel der „herpesbereiten" Individuen sogar regelmäßig Virus enthalten sollte, erscheint also *nicht erfüllt* und es bleibt somit nichts anderes übrig als auch diese Variante der Ubiquitätstheorie bei dem gegenwärtigen Stande der Forschung abzulehnen.

Die Lehre von der endogenen Ubiquität des Herpesvirus läßt sich aber schließlich noch auf einer anderen Basis diskutieren. Man kennt eine Krankheitsform, die Febris herpetica, welche nur durch zwei Symptome (Fieber und Herpesausschlag) charakterisiert ist und die

man — wenn auch ohne zwingenden Grund, so doch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit — als eine Allgemeininfektion des menschlichen Organismus mit Herpesvirus aufgefaßt hat; trifft diese Vermutung zu, so wäre die Möglichkeit einer Generalisation der hypothetischen Herpeskeime auf hämatogenem Wege bzw. einer *Einschleppung in das Blut*, vielleicht auch einer *Vermehrung im Blute* gegeben. Andrerseits konnte zuerst durch *Doerr* und *Vöchting*, später durch *Blanc* und *Caminopetros*, *Doerr* und *Schnabel*, *Salmann*, *Levaditi*, *Goodpasture* und *Teague*, *Marinescu* und *Draganescu*, *A. v. Szily*, *Mariani*, *Rose* und *Walthard* u. a. festgestellt werden, daß das Herpesvirus im Tierexperiment eine ausgesprochene Affinität zum Zentralnervensystem bekundet und es war daher auch mit einer Einwanderung von Herpeskeimen in die *Gewebe des Zentralnervensystems* und in den *Liquor cerebrospinalis* zu rechnen. In dieser Beziehung kam noch als unterstützendes Moment die Tatsache hinzu, daß man in einigen wenigen Fällen im Liquor und in der Hirnsubstanz von Menschen de facto ein Virus nachgewiesen hatte, das sich von authentischem Herpesvirus weder durch seine Pathogenität (*Levaditi*) noch durch seine immunisatorischen Eigenschaften (*Doerr* und *Schnabel*) unterschied; daß solche Befunde (von einem Falle von *Flexner* abgesehen) nur bei Fällen von Encephalitis epidemica s. lethargica erhoben wurden, ist für das Problem der Herpespathogenese zwar nicht irrelevant, braucht jedoch hier nicht weiter erörtert zu werden (vgl. *Doerr*, l. c.).

Auf diesen Prämissen fundierten *Bastai* und *Busacca* die Vorstellung, daß sich die herpetische Infektion nicht auf die Haut, die Cornea oder die Schleimhäute beschränkt, sondern daß mit großer Regelmäßigkeit — sei es nun primär oder sekundär — ein Übertritt spezifischer Viruselemente *ins Blut* und *in den Liquor* erfolgt, wo sich dann die Keime nach Ablauf der klinischen Manifestationen durch Jahre hindurch oder sogar lebenslänglich in infektionstüchtigem Zustande erhalten. Rezidive, symptomatische oder provozierte Herpeseruptionen betrachten *Bastai* und *Busacca* nur als *akute Exacerbationen* einer *chronischen symptomlosen Infektion*, die als *das gesetzmäßige Residuum einer primären Ansteckung zurückbleibt*.

Bastai und *Busacca* haben ihre Theorie durch ausgedehnte Untersuchungen gestützt, die in verschiedenen Zeitschriften (Acad. di Medicina di Torino 1923 und 1924, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 4 und 11, Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 31) veröffentlicht wurden, zuletzt in sehr ausführlicher und anscheinend abschließender Fassung im Schweiz. Arch. f. Neurol. u. Psychiatrie **15**, H. 2. 1924 und **16**, H. 1. 1925. Da angenommen werden kann, daß dieses Archiv den am Herpesproblem enger interessierten Mikrobiologen nicht überall zugänglich sein dürfte, und da der betreffende Artikel überdies in italie-

nischer Sprache abgefaßt ist, mögen die wesentlichsten Angaben hier kurz zusammengestellt werden. Auf eine eingehende Kritik der zahlreichen Einzelversuche müssen wir wegen Raummangel notgedrungen verzichten, empfehlen aber das genaue Studium des Originals, da die Bewertung der erzielten Resultate als positiv oder negativ in vielen Fällen anfechtbar erscheint.

Bastai und *Busacca* entnahmen bei einer größeren Zahl von Individuen *Blut* und *Liquor* und prüften das aus dem Blut abgeschiedene Serum sowie den Liquor auf ihre spezifische Pathogenität für die Cornea des Kaninchens. Entwickelte sich nach der Verimpfung der Proben eine Keratoconjunctivitis, so wurde der herpetische Charakter derselben durch weitere corneale (z. T. auch subdurale) Kaninchenpassagen sowie durch Feststellung des Immunitätszustandes (refraktäres Verhalten der abgeheilten Corneae gegen die Inokulation von authentischem Herpesvirus) zu sichern versucht. Die folgende Tabelle gibt Aufschluß:

a) über die Zahl der untersuchten Personen;

b) über den Infektionszustand derselben d. h. über das Bestehen oder Nichtbestehen einer manifesten herpetischen Infektion zur Zeit der Materialentnahme sowie (im erstgenannten Falle) über die Lokalisation der herpetischen Erkrankung;

c) über die Zahl der negativen und der positiven Befunde (nach der Einschätzung von *Bastai* und *Busacca*); die positiven Ergebnisse werden in 3 Kategorien gesondert, je nachdem bei dem betreffenden Individuum nur im Blute oder nur im Liquor oder im Blut und im Liquor der Nachweis von Herpesvirus geführt worden war.

Infektionszustand	Zahl der untersuchten Fälle	Davon		Von den positiven Fällen hatten Herpesvirus		
		positiv	negativ	im Blute	im Liquor	im Blute und im Liquor
I. Herpes labialis	16	3	13	1	1	1
II. Herpes corneae	1	1	—	—	—	1
III. Keratitis dendritica	2	2	—	—	2	—
IV. Keratitis disciformis	2	2	—	—	1	1
V. Rezidivierende Erosionen der Cornea	1	1	—	—	—	1
VI. Herpes corneae postoperatorius	2	2	—	2	—	—
VII. Abgelaufener Herpes	1	1	—	1	—	—
VIII. Herpesfreie, nicht besonders ausgewählte Personen	21	18	3	—	4	14
IX. Experimenteller Hautherpes	4	3	1	—	2	1
X. Experimentelle Verimpfung auf die Cornea von Versuchspersonen	4	4	—	1	—	3
Summe von I—X	54	37	17	5	10	22

Der außerordentlich hohe Prozentsatz positiver Blut- und Liquorbefunde (68%) steht vorerst in schroffem Widerspruch mit den *durchwegs negativen Ergebnissen* anderer Autoren, die bei der Durchprüfung eines imponierenden Materials erzielt wurden (*Löwenstein, Schnabel, Friedli* und *Doerr, Mariani, Nicolau* und *Poincloux, Doerr* und *Zdansky, Flexner* und *Amoss, Rose, Ford* und *Amoss*). In die Zeit vor *Bastai* und *Busacca* fallen zwar ein paar Berichte über den gelungenen Nachweis von Herpesvirus im strömenden Blut oder in der Cerebrospinalflüssigkeit von Herpeskranken (*Ravaut* und *Rabeau, Bastai, Veratti* und *Sala*); sie betrafen aber nur ganz vereinzelte Fälle und können überdies zur Entscheidung der strittigen Frage nicht herangezogen werden, da keine zureichenden Beweise für die herpetische Natur der am Kaninchen beobachteten Impfreaktionen erbracht wurden. Nur gegen die 2 positiven Befunde von *Bastai* (Arch. per le scienze med. 1922) kann der letztgenannte Einwand nicht geltend gemacht werden; wohl aber weiß man auch hier nicht, ob die Versuchsanordnung jede Möglichkeit einer *zufälligen Stallinfektion mit Herpesvirus* sicher ausgeschlossen hatte.

Die Zahlen von *Bastai* und *Busacca* stimmen ferner *untereinander* nicht überein (vgl. *Doerr*, Zentralbl. f. Haut- u. Geschlechtskrankh., **13**, H. 9). Von **16** spontan aufgetretenen cutanen Herpesfällen gaben nur 3, von 4 experimentell erzeugten ebenfalls 3 positive Resultate. Der geringe Prozentsatz der Fälle von Herpes labialis, bei welchen das spezifische Virus im Blut oder Liquor festzustellen war, läßt sich auch nicht mit der Angabe in Einklang setzen, daß die Untersuchung bei 21 herpesfreien Individuen, die nicht besonders ausgewählt waren (scelti a caso), in 18 Fällen positiv ausfiel. Man sollte doch annehmen, daß *das akute Stadium der herpetischen Infektion* weit günstigere Chancen für den Nachweis der in den Liquor, namentlich aber in das Blut eingewanderten Keime bietet als die von *Bastai* und *Busacca* hypothetizierte Phase des *„latenten Mikrobismus"*. Aus der Rubrik VIII würde sich endlich ergeben, daß man geradezu Mühe haben müßte, unter erwachsenen, zur Zeit nicht an floridem Herpes leidenden Menschen Personen ausfindig zu machen, bei denen weder im Blut noch im Liquor Herpesvirus in nachweisbaren Mengen vorhanden ist; die 4 Individuen der Horizontalkolumne IX hatten aber *vor* der experimentellen Einimpfung von Herpesgift durchweg einen Liquor, *der für die Kaninchencornea vollständig apathogen war*, ein Gegensatz, für den sogar das sog. Gesetz der Serie keine „Erklärung" zu liefern vermag.

Bastai und *Busacca* führen jedoch die Unstimmigkeiten in ihren eigenen Befunden und die abweichenden Ergebnisse anderer Autoren auf die *Verschiedenheiten der jeweils angewendeten Untersuchungstechnik* zurück. Ob die Verimpfung von Blut oder Liquor auf die Kaninchencornea ein positives oder ein negatives Resultat gibt, hängt nach ihrer

Ansicht nicht nur davon ab, ob das verimpfte Material Herpesvirus enthält oder nicht; auch nach der Übertragung von virushaltigen Flüssigkeiten kann der typische Effekt (eine spezifische Keratoconjunctivitis mit nachfolgender lokaler oder allgemeiner Immunität) ausbleiben, wenn die inokulierte Dosis zu klein bzw. wenn die Konzentration der Herpeskeime in der betreffenden Flüssigkeit zu gering ist. Von dieser Vorstellung ausgehend bedienten sie sich einer *Anreicherungsmethode*, welche den Zweck verfolgte, die Dosis pathogenes minima der Erregerelemente auf ein kleineres Flüssigkeitsvolum einzuengen und verfuhren hierbei auf folgende Weise:

10 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit (Blutserum oder Liquor) wurden in ein steriles Uhrschälchen eingefüllt und in einem gewöhnlichen Exsiccator über wasserfreiem $CaCl_2$ (bei Zimmertemperatur und bei 2—7 mm Hg-Druck) eingedickt, entweder auf $^1/_{10}$ des Ausgangsvolums oder bis zur Trockenkonsistenz; in letzterem Falle mußte der Rückstand knapp vor der Überimpfung auf die Kaninchenhornhaut in einigen Tropfen *Ringer*-Lösung wieder aufgelöst werden. Um 10 ccm Serum oder Liquor vollständig abzudampfen, waren in der Regel weniger als 24 Stunden erforderlich.

Die theoretischen Grundlagen dieser Konzentrationsmethode sind ausnahmslos unbewiesene (stillschweigend als richtig betrachtete) Voraussetzungen. Es wird angenommen:

1. daß das Herpesvirus ein lebender, vermehrungsfähiger Mikrobe sein muß;

2. daß die Pathogenität für die Kaninchencornea von dem Gehalt der verimpften Flüssigkeiten an lebenden Herpeserregerzellen abhängt, implizite wohl auch, daß ein einziger in das Hornhautgewebe inserierter Herpeskeim nicht genügt, um eine haftende und fortschreitende Infektion hervorzurufen (Fehlen der sog. Einkeimdisposition);

3. daß schon eine Zunahme des Gehaltes an Herpeskeimen auf das Zehnfache genügt, um einen deutlichen Ausschlag zu geben d. h. um die Pathogenität der zu prüfenden Flüssigkeit für die Kaninchencornea merklich zu steigern;

4. daß die verschiedenen mit der Eindickung verbundenen Prozeduren (24stündige Aufbewahrung des Materials bei Zimmertemperatur, Änderung der Reaktion und Salzkonzentration der virushaltigen Flüssigkeiten infolge der Eindampfung, völlige Austrocknung) die hypothetischen Herpeskeime weder vernichten noch auch in ihrer Virulenz (Infektiosität) so schädigen, daß der angebliche Vorteil der relativen Keimvermehrung dadurch überkompensiert wird.

Manche dieser Prämissen sind an sich wohl geeignet, Bedenken zu erwecken und harmonieren auch nicht mit den vereinzelten, aus der Herpesliteratur bekannten Daten über die Widerstandsfähigkeit von

in Körperflüssigkeiten suspendiertem Herpesvirus gegen äußere Einflüsse (vgl. *Doerr*, l. c.). Indes schienen hier *systematische Untersuchungen* notwendig zu sein, um die wichtige Frage präzis beantworten zu können, ob die Methode von *Bastai* und *Busacca* tatsächlich einen Fortschritt in der Technik des Nachweises von Herpesvirus bedeutet oder *ob sie nicht vielmehr auf prinzipiellen Irrtümern beruht, welche eine Änderung der mit nativem Blut oder Liquor gewonnenen Resultate im Sinne einer Erhöhung der positiven Befunde von fast Null auf* 68% *a priori sicher ausschließen.* Diese Alternative konnte durch die in Abschnitt I dieser Mitteilung kurz wiedergegebenen Versuche eindeutig entschieden werden.

I.

A.

Infektiöser Inhalt von menschlichen Herpesblasen oder Conjunctivalsekret von corneal geimpften Kaninchen büßen ihre Virulenz ein, wenn man die genannten Flüssigkeiten auch nur kurze Zeit an der Luft oder im Exsiccator über $CaCl_2$ (ohne Evakuierung) eintrocknen läßt.

Die Virulenz der Flüssigkeiten wurde in diesen wie in allen folgenden Versuchen ausschließlich an der Kaninchencornea geprüft. Mit jeder Probe wurden 2 Corneae (eines Kaninchens) geimpft. Die Technik war stets die gleiche: Cocainisierung, Anlegung von 2 seichten, äquatorialen, zueinander parallelen und von einem Hornhautrand bis zum anderen reichenden Scarificationen, Einträufeln des Impfmaterials in den Bindehautsack und sanftes Verreiben desselben in die verwundete Cornea mit Hilfe der geschlossenen Lider. Jedes Kaninchen kam in einen besonderen, desinfizierten Käfig und blieb daselbst während der ganzen Beobachtungsdauer. Bei den Impfungen und den Besichtigungen der geimpften Tiere wurden alle Vorsichtsmaßregeln beachtet, um eine zufällige Übertragung von Herpesvirus durch Instrumente, durch die Hände des Experimentators und der Assistenten, durch Abwischen von Sekret mit gebrauchten Wattetampons usw. zu vermeiden. Die Ergebnisse dürfen in dieser Hinsicht als zuverlässig bzw. einwandfrei gelten.

Eingetrocknetes Material wurde sorgfältig (möglichst quantitativ) in 0,2 ccm Ringer-Lösung aufgelöst bzw. aufgeschwemmt und das gesamte Volum der erhaltenen Flüssigkeit zur Übertragung verwendet.

Als positiv verzeichneten wir alle Versuche, in denen sich auf beiden Augen des geimpften Kaninchens eine typische Keratoconjunctivitis nach einer Inkubation von längstens 14 Tagen entwickelte. Reaktionen nach mehr als 6tägiger Inkubation kamen übrigens gar nicht zur Beobachtung; ebensowenig ereignete sich der Fall, daß die Impfung nur auf einem der beiden Augen zu einer evidenten Erkrankung führte, während das andere normal blieb.

Als negativ galten alle Fälle, in denen die geimpften Corneae durch 14 Tage hindurch (abgesehen vom Impftrauma) keine krankhafte Veränderung zeigten und in denen sich auch kein von Sekretion und lebhafter Hyperämie begleiteter Entzündungszustand der Conjunctiva palpebrarum entwickelte. Wo hinsichtlich der positiven oder negativen Bewertung der Befunde auch nur der geringste Zweifel bestand, wurden weitere corneale Passagen angelegt und Immunitätsprüfungen nach dem Abklingen der Impfreaktionen (frühestens nach 3 Wochen) vorgenommen.

Dies vorausgeschickt, können die Ergebnisse in folgender Form resümiert werden, ohne Mißverständnisse oder Unvollständigkeiten befürchten zu müssen:

Bezeich. d. beidseits corneal geimpft. Kanin.	Verimpftes Material	Behandlung des Materiales vor der Verimpfung	Resultat (einschließlich der Immunitätsprobe)
Nr. 106	Inhalt peribuccaler Herpesblasen von Patient O. M.	Frisch verimpft.	*Typische Reaktion.*
Nr. 106a	Dasselbe Material.	24 Stunden auf Objektträgern bei Zimmertemperatur und freiem Luftzutritt getrocknet.	**Null**; die Augen erweisen sich nach 21 Tagen als *nicht immun.*
Nr. 100	Inhalt von Herpesblasen auf den Gesäßbacken von Patient A. N.	Frisch verimpft.	*Typische Reaktion.*
Nr. 101	Dasselbe Material.	$6^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur in einer Porzellanschale getrocknet.	**Null**, *keine lokale Immunität.*
Nr. 110	Augensekret eines corneal mit virulenter Hirnsubstanz inokulierten Kaninchen Nr. 108.	Frisch verimpft.	*Typische Reaktion.*
Nr. 111	Dasselbe Material.	4 Stunden im Exsiccator bei Zimmertemperatur ohne Vakuum getrocknet (Uhrglas).	**Null.**
Nr. 112	desgl.	9 Stunden im Exsiccator getrocknet.	**Null.**
Nr. 113	desgl.	12 Stunden im Exsiccator getrocknet.	**Null.**

B.

Hochvirulenter Inhalt von Herpesblasen oder hochvirulentes Augensekret von mit Keratoconjunctivitis herpetica behafteten Kaninchen verlieren somit ihre Pathogenität für die Kaninchencornea rasch und vollständig, wenn man solche Flüssigkeiten auf Glas- oder Porzellanflächen (sei es bei offenem Luftzutritt oder im Exsiccator) bei Zimmertemperatur eintrocknen läßt. Es wäre aber durchaus möglich, *daß sich Herpesvirus in menschlichem Blutserum oder in menschlichem Liquor cerebrospinalis ganz anders verhält.* Wissen wir doch aus der Bakteriologie, daß die Resistenz pathogener Keime gegen Austrocknung in den weitesten Grenzen schwanken kann, je nachdem die Mikroben in physio-

logischer NaCl-Lösung oder in eiweißreichen Flüssigkeiten suspendiert bzw. in Sputum, Eiter, Fibrinmembranen eingeschlossen sind (Tuberkel-, Diphtheriebacillen usw.). Für das Herpesvirus speziell konnte gezeigt werden, daß es der Austrocknung 200 Tage und mehr widersteht, wenn man als virushaltiges Material nicht den Inhalt von Herpesblasen, sondern das Gehirn von an Encephalitis herpetica verendeten Kaninchen verwendet (*Le Fèvre de Arric*).

Um diesem Einwand zu begegnen, vermengten wir in einer zweiten Versuchsserie den Inhalt von Herpesblasen sowie das virulente Augensekret von Kaninchen

1. mit größeren Mengen von Menschenserum und
2. mit ähnlichen Volumina von normalem Liquor cerebrospinalis,

und prüften im *Grüter*schen Cornealversuch: a) die Pathogenität des Ausgangsmateriales, b) die Pathogenität der frisch hergestellten Mischungen desselben mit Menschenserum oder Menschenliquor und c) die Pathogenität derselben Mischungen nach vorausgegangener Eindickung auf $^1/_{10}$ oder nach erfolgter Eintrocknung im Exsiccator.

Bezeichn. d. beidseits corneal geimpften Kaninchens Nr.	Verimpftes Material	Behandlung des Materiales vor der Verimpfung	Resultat
121	*Augensekret von Kaninchen Nr. 300.*	Frisch und ohne Zusatz verimpft.	*Typische Reaktion.*
122	desgl.	Vermengt mit *2 ccm Menschenserum.*	*Typische Reaktion.*
123	desgl.	Vermengt mit 2 ccm Menschenserum, auf $^1/_{10}$ im Exsiccator eingedickt.	**Null.**
124	desgl.	Vermengt mit 2 ccm Menschenserum, im Exsiccator völlig eingetrocknet (14 St.).	**Null.**
126	*Blaseninhalt von Pat. B. P.*	Frisch verimpft.	*Typische Reaktion.*
127	desgl.	0,1 ccm + *1 ccm Menschenserum*, im Exsiccator auf 0,1 ccm eingedickt	**Null.**

Blutserum vom Menschen schützt somit das in demselben suspendierte Herpesvirus nicht gegen die deletäre Wirkung des Eindampfens oder der völligen Austrocknung, wobei noch überdies zu berücksichtigen ist, daß es sich in den obigen Versuchen um *hochvirulentes* Material (Blaseninhalt, Augensekret von Kaninchen) gehandelt hat, welches auch nach dem 10—40fach verdünnenden Zusatz von Menschenserum nicht die

geringste Abschwächung seiner Pathogenität für die Kaninchencornea zeigte. Bei dem Kaninchen Nr. 122 (Virus + 2 ccm Menschenserum) trat die Keratoconjunctivitis *nach derselben kurzen Inkubation von 48 Stunden* auf wie bei Nr. 121, das mit dem frischen Material ohne Serumzusatz geimpft worden war, und die Erscheinungen an den Hornhäuten und Bindehäuten zeigten die gleiche Intensität. Die Tatsache, daß der Zusatz von Menschenserum allein (d. h. ohne nachfolgende Abdampfung des Gemenges) das Virus nicht zu neutralisieren vermochte, schließt auch die Möglichkeit aus, daß wir zufälligerweise Menschensera benützt hatten, welche *virulicide Stoffe* enthielten, eine Eventualität, mit welcher man nach den Angaben von *Flexner* und *Amoss* immerhin zu rechnen hatte (Journ. of exp. med. **41**, S. 373f. 1925).

Die Sache liegt also so, daß Herpesvirus, in menschlichem Blutserum in erheblicher (leicht nachweisbarer) Konzentration suspendiert, **unwirksam** wird, wenn man das Gemenge der Konzentrationsmethode von *Bastai* und *Busacca* unterwirft; von einer Anreicherung d. h. einer Verstärkung der Pathogenität kann keine Rede sein. Damit erscheinen die positiven Blutbefunde der genannten Autoren, soweit sie mit dieser Technik erzielt wurden (das trifft für fast alle 27 positiven Resultate der Tabelle auf S. 106 zu) entwertet. Wenn Herpesvirus im Blute von Herpeskranken, Herpesrekonvalszenten, Herpesträgern wirklich vorhanden wäre, *müßte es sich durch Übertragung des frischen, nativen Blutes oder des daraus abgeschiedenen Serums weit öfter nachweisen lassen als durch Verimpfung eingedampfter oder eingetrockneter Sera*; das ist aber nach den übereinstimmenden Angaben aller anderen Autoren und nach den eigenen Erfahrungen von *Bastai* und *Busacca* nicht der Fall. Dafür, daß es im Stadium des floriden Herpes zu einer Einschwemmung oder gar zu einer Vermehrung des Virus in der Zirkulation kommt, besitzen wir also derzeit keinen zwingenden Beweis; und noch viel weniger können wir behaupten, daß nach dem Abklingen manifester Herpessymptome eine chronische latente Infektion des Blutes durch kürzere oder längere Zeit persistiert. Die an letztere Annahme geknüpften Kombinationen über die Pathogenese des rezidivierenden und des provozierten Herpes sind vorläufig als nicht begründet abzulehnen.

Etwas komplizierter gestalteten sich unsere Untersuchungen über *das Verhalten von Herpesvirus im* ***Liquor cerebrospinalis***. Wie bereits erwähnt, gingen wir auch hier zunächst so vor, daß wir hochvirulentes Ausgangsmaterial (Herpesblaseninhalt oder Augensekret von Kaninchen) mit Liquor vermengten (etwa im Verhältnis von 0,05 ccm auf 3 bis 5 ccm Liquor), und die Gemenge teils sofort, teils nach erfolgter Eindikkung oder Eintrocknung auf die Corneae von Kaninchen verimpften. *Hier erwiesen sich aber die Gemenge im Gegensatze zu den Versuchen*

mit Blutserum auch nach der Konzentration auf ein kleineres Volum noch als pathogen, wie aus folgender Übersicht erhellt:

Bezeichn. d. beidseits corneal geimpften Kaninchen Nr.	Verimpftes Material	Behandlung des Materiales vor der Verimpfung	Resultat
134	*Blaseninhalt von Pat. E. K.*	Frisch und ohne Zusatz verimpft.	*Typische, schwere Reaktion*; Inkubation 36 Stunden.
135	desgl.	Nach Zusatz von 3 ccm Liquor verimpft.	*Typische, schwere Reaktion*; Inkubation 36 Stunden.
136	desgl.	Wie bei Nr. 135, aber nach vorheriger Eindickung im Exsiccator (Vakuum) auf $^1/_{10}$; 12stündiges Verweilen im Exsiccator.	**Nach 5tägiger Inkubation beidseitige Keratoconjunctivitis mäßigen Grades,** die in einer Woche völlig ausheilt. Eine weitere corneale Passage mit dem Augensekret von 136 gibt bei Kan. 136b eine typische Reaktion nach einer Inkubation von 48 St.
140	*Augensekret von Kan. 300* (vgl. Kan. 121).	Frisch und ohne Zusatz verimpft.	Nach 24stündiger Inkubation *typische, schwere Reaktion* mit anschließender Encephalitis.
141	desgl.	Frisch, aber nach Zusatz von 5 ccm Liquor verimpft.	*Wie bei Kan. Nr. 140.*
142	desgl.	Nach Zusatz von 5 ccm Liquor im Vakuum zur Trockne eingedampft.	**Nach 5tägiger Inkubation beidseitige mittelschwere Keratoconjunctivitis;** Abheilung in 8 Tg. Eine corneale Passage mit dem Augensekret von 142 gibt bei Kan. 142b eine typische, schwere Reaktion (Ink. 48 St.) mit einer Heilungsdauer von 20 Tagen.
143	*Blaseninhalt von Pat. F. P.*	Frisch und ohne Zusatz verimpft.	*Typische, schwerste Reaktion*; Inkubation 48 Stunden.
144	desgl.	Nach Zusatz von 5 ccm Liquor.	*Wie bei Kan. Nr. 143.*
145	desgl.	Nach Zusatz von 5 ccm Liquor im Vakuum eingetrocknet (14 St.).	**Nach 5tägiger Inkubation mäßige Keratoconjunctivitis.** Die Corneae erweisen sich 3 Wochen später als völlig immun.

In Liquor aufgeschwemmt widersteht somit Herpesvirus der Eindickung oder völligen Austrocknung weitaus besser, als wenn es in Blutserum verteilt oder in Form von nativem Herpesblaseninhalt oder von nativem Conjunctivalsekret der Abdampfungsprozedur unterworfen wird. Daß der Liquor so ausgesprochene konservierende Eigenschaften besitzt, die vielleicht auch gegenüber anderen Agenzien in Erscheinung treten, ist im Hinblick auf die Neurotropie dieses Infektionsstoffes gewiß von Interesse; man darf daraus, wenn auch mit Vorbehalt, schließen, daß der Liquor ein für das Herpesvirus besonders günstiges (adäquates) Milieu darstellt. Was aber die Frage anlangt, ob die von *Bastai* und *Busacca* angewendete Konzentrationsmethode den Nachweis spärlicher Herpeskeime im Liquor erleichtert, muß die Antwort entschieden verneinend lauten. Obzwar die Kaninchen Nr. 136, 142 und 145 mit 10—50fach eingeengten Virus-Liquorgemischen geimpft worden waren, reagierten sie durchwegs nicht stärker als die mit den nicht eingeengten Gemischen infizierten Kontrolltiere Nr. 135, 141 und 144, *sondern effektiv schwächer*. Die Inkubation stieg von $1^1/_2$ bis 2 regelmäßig auf 5 Tage an, die Augenerkrankungen verliefen milder und endeten schon innerhalb einer Woche mit völliger restitutio ad integrum (ohne Hinterlassung von Hornhautnarben oder chronischen Reizzuständen der Bindehaut) und das Übergreifen auf das Zentralnervensystem blieb dort aus, wo es bei dem nicht eingedampften gleichen Virus-Liquorgemisch zu beobachten war (Kaninchen Nr. 142 bzw. 140 und 141). Zweifellos hatte demnach die Einengung der Virus-Liquor-Gemische zu einer deutlichen Reduktion der Infektiosität geführt, die erst durch weitere Passagen wieder partiell rückgängig gemacht werden konnte (Kaninchen Nr. 136b und Nr. 142b).

Die Einengung von virushaltigem Liquor cerebrospinalis nach *Bastai* und *Busacca* bewirkt also das Gegenteil des angestrebten Endeffektes: *sie setzt eine evtl. vorhandene starke Pathogenität des Liquors herab und erschwert dadurch den Virusnachweis.* Ja man kann noch einen Schritt weiter gehen und zeigen, daß Liquorproben, die von Haus aus nur **geringe Konzentrationen von Herpesvirus** enthalten, durch das Verfahren von *Bastai* und *Busacca völlig avirulent werden* oder daß sich mit anderen Werten die Schutzwirkung des Liquors gegen Eintrocknen oder Eindicken nur dann beobachten läßt, wenn man dem Liquor ganz erhebliche Mengen von hochvirulentem Material zusetzt.

C.

Um diese Behauptung experimentell zu verifizieren, bedienten wir uns einer *quantitativen Methodik*, die zwar auf dem bekannten Dilutionsprinzip beruhte, in dieser Form aber bisher in der Herpesforschung noch nicht angewendet worden war. Ein Fall mit ausgedehntem peri-

buccalem Herpes (Patient B. D.) bot die Gelegenheit, soviel frischen, **völlig wasserklaren** Blaseninhalt mit Capillarpipetten zu sammeln, daß ein ganz bestimmtes Volum mit Hilfe einer graduierten Pipette abgemessen und in ein Reagensglas übertragen werden konnte. Ferner verschafften wir uns ein größeres Quantum von normalem, ebenfalls völlig klarem *Liquor cerebrospinalis* (von dessen völliger Apathogenität für das Kaninchenauge wir uns vorher durch entsprechende Kontrollversuche überzeugt hatten) und stellten nun Verdünnungen des Blaseninhaltes mit dem Liquor in folgenden Verhältnissen her:

1 : 1	1 : 400	1 : 3200
1 : 100	1 : 800	
1 : 200	1 : 1600	

Mit diesen Verdünnungen wurden nun Kaninchen beidseits corneal infiziert. Das Resultat ist aus der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen, aus welcher auch die *Inkubation der erzielten Reaktionen* ersichtlich ist, ferner *das Resultat der nach 3 Wochen mit einem einheitlichen, hochvirulenten und konzentrierten Material vorgenommenen Immunitätsprüfung*, endlich das Ergebnis der in mehreren Fällen mit dem Augensekret der betreffenden Tiere angelegten weiteren cornealen Übertragungen (Passagen).

Bezeichn. d. beidseits corneal geimpften Kaninchen Nr.	Konzentr. d. virulent. Blaseninhaltes im verimpften Liquor	Resultat und Inkubation der erzielten Keratoconjunctivitis	Immunitätsprüfung an den Corneae	Übertragungsversuche mit dem Sekret der reagierenden Augen auf die Corneae anderer Kaninchen
1	1 : 1	*Schwerste Reaktion*; Inkubation 48 St.	—	—
2	1 : 100	*Schwerste Reaktion*; Inkubation 3 Tage.	Immun.	Kan. 26, *schwerste Reaktion*, Inkubation 2 Tg.
3	1 : 200	*Schwere Reaktion*; Inkubation 3 Tage.	Immun.	—
4	1 : 400	*Schwere Reaktion*; Inkubation 3 Tage.	Immun.	Kan. 46, *schwere Reaktion*, Inkubation 2 Tg.
5	1 : 800	*Mäßige Reaktion*; Inkubation links 3, rechts 6 Tage.	Immun.	Kan. 56, geimpft vom rechten Auge von Kan. 5, *schwere Reaktion*, Inkubation 2 Tg.
6	1 : 1600	Rechts **Null**, links schwacher Reizzustand.	*Beidseits stärkste Reaktion*; *letale Encephalitis.*	Kan. 66, geimpft vom linken Auge von Kaninchen 6. **Null.**
7	1 : 3200	*Mäßig starke Reaktion*; Inkubation rechts 5, links 4 Tage.	Immun.	Kan. 76, geimpft vom linken Auge von Kaninchen 7, *schwerste Reaktion*, Inkubation 2 Tage.

Von jeder Verdünnung (1 : 1 natürlich ausgenommen) wurden je 2,5 ccm in ein steriles Uhrschälchen gefüllt und über $CaCl_2$ im evakuierten Exsiccator bei 7 mm Hg-Druck bis zur Trockene eingedampft, was (vom Momente der Herstellung der Verdünnungen an gerechnet) 10 Stunden in Anspruch nahm. Der Trockenrückstand wurde möglichst quantitativ in 0,1 ccm Ringerlösung aufgenommen, so daß eine *Volumseinengung auf das 25 fache* resultierte. Mit diesen eingeengten Verdünnungen wurde nun eine zweite Serie von Kaninchen beidseits corneal infiziert und im übrigen genau so verfahren wie bei der ersten Serie; insbesondere wurde zu den Immunitätsprüfungen das gleiche virushaltige Material verwendet wie bei den Kaninchen 1—7, was insofern keine Schwierigkeiten bereitete, als die cornealen Reinfektionen sämtlich zur gleichen Zeit vorgenommen werden konnten.

Bez. der Kaninchen	Konzentration d. Liquorverdünn. vor dem Abdampf.	Resultat und Inkubation der erzielten Keratoconjunctivitiden	Immunitätsprüfung	Übertragungsversuche mit dem Sekret der reagierenden Augen auf die Corneae anderer Kaninchen
II.	1 : 100	Geringgradige, rasch abheilende Keratoconjunctivitis. Inkubation rechts 5, links 6 Tage.	Immun.	Kan. IIb, geimpft vom rechten Auge von Kan. II: schwere Reaktion nach einer Inkubation von 24 St. mit nachfolgender Immunität.
III.	1 : 200	**Null.**	*Schwerste Reaktion*, verendet nach 7 Tagen (Encephalitis?).	—
IV.	1 : 400	**Null.**	*Schwerste Reaktion*; letale Encephalitis.	—
V.	1 : 800	**Null.**	*Schwerste Reaktion*; letale Encephalitis.	—
VI.	1 : 1600	**Null.**	*Schwerste Reaktion*; letale Encephalitis.	—
VII.	1 : 3200	**Null.**	*Schwerste Reaktion*; geht intercurrent an Coccidiose ein.	—

Dieses in allen seinen Teilen harmonisch verlaufene Experiment gestattet die Ableitung einiger wichtiger Schlüsse, und zwar:

1. Wasserklarer (von suspendierten mikroskopischen Partikeln freier) Inhalt von Herpesblasen kann bis auf das 800fache mit Liquor verdünnt werden, ohne seine Infektiosität für die Kaninchencornea (im *Grüter*schen Übertragungsversuch) völlig einzubüßen. Die obere Verdünnungsgrenze, jenseits welcher der Blaseninhalt die scarifizierte Cornea nicht mehr zu infizieren vermag, muß nicht scharf ausgeprägt sein, so daß unter Umständen die schwächere Verdünnung als unwirksam (Kaninchen Nr. 6), die stärkere noch als pathogen befunden wird

(Kaninchen Nr. 7); solche Unstimmigkeiten könnten sowohl auf der verschiedenen individuellen Empfänglichkeit der Versuchstiere als auch auf dem Dispersitätsgrad des Virus beruhen, welches im Blaseninhalt vermutlich nicht im gelösten Zustande, sondern in Form von submikroskopischen corpusculären Elementen enthalten ist. Die letztgenannte Erklärung ist die wahrscheinlichere und macht die widerspruchsvollen Angaben *über die Filtrierbarkeit des Herpesvirus* verständlich. Will man nämlich Herpesblaseninhalt durch Hart- oder Membranfilter filtrieren, so muß man denselben aus technischen Gründen stets stark verdünnen; wenn dann das Filtrans die Kaninchencornea noch infiziert, das Filtrat aber nicht mehr, so erscheint es nicht statthaft, das negative Ergebnis auf die Undurchlässigkeit des Filterkörpers zu beziehen, da eine prozentuelle Verarmung des Filtrates an Viruselementen bzw. eine partielle Retention derselben in den Filterporen den gleichen Effekt haben könnte.

2. Durch bloße Verdünnung eines an sich hochvirulenten, mit wässerigen Flüssigkeiten exakt mischbaren Substrates (Herpesblaseninhalt) sinkt die Pathogenität von dem ursprünglichen Maximum unter Passierung mehrfacher Zwischenstufen auf Null ab. Die Zwischenstufen sind charakterisiert durch sukzessive (mit steigender Verdünnung) zunehmende Inkubation, durch abnehmende Intensität und rascheren Ablauf der pathologischen Veränderungen an der Cornea und Conjunctiva. Die Ursache kann in diesem Falle wohl nur *in der sinkenden Konzentration des Herpesvirus* bzw. *in der Verminderung des Gehaltes an spezifischen, vermehrungsfähigen Viruselementen gesucht werden*; eine Abschwächung der Virulenz kommt nicht in Betracht, wird aber — falls man die Versuchsbedingungen nicht kennt — vorgetäuscht. Man ersieht aus diesem Beispiel, daß die Intensität der pathologischen Einwirkungen verschiedener Substrate auf das Kaninchenauge bisher mit Unrecht als ein zuverlässiger Maßstab für die Virulenz der in diesen Substraten vorhandenen Herpesstämme betrachtet wurde, weil man hiebei den wichtigen Faktor des Keimgehaltes gänzlich vernachlässigt hat.

Auffallend war, daß die Verdünnung des Blaseninhaltes auf das 100fache gar keine Abnahme der Pathogenität (im Vergleich zum Ausgangsmaterial) zur Folge hatte, und daß auch noch eine weitere Dilution auf das 400fache nur eine geringgradige Abschwächung bewirkte, während ein Ansteigen der Verdünnung von 1 : 400 auf 1 : 800 schon stark zum Ausdruck kam und 1 : 1600 im Cornealversuch völlig versagte. Zwischen dem aufs Doppelte und dem aufs 100—400fache verdünnten Blaseninhalt besteht eine sehr große, zwischen dem 400fach und dem 1600fach diluierten eine minimale Konzentrationsdifferenz. Aus äußeren Gründen waren wir noch nicht in der Lage, dieses Phänomen einer

genaueren experimentellen Analyse zu unterziehen und die gefundenen Verhältnisse mit den für andere filtrierbare Virusarten sowie für Bakteriophagen geltenden gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Konzentration und Pathogenität zu vergleichen; doch sind bereits Untersuchungen in dieser Richtung im Basler hygienischen Institut im Gange. Vorläufig kann nur konstatiert werden, daß das Herpesvirus durch fortschreitende Verdünnungen mehr wie das tumorerzeugende Agens des *Rous*schen Hühnersarkoms (*Alexis Carrel*) beeinflußt wird und von dem Verhalten anderer filtrierbaren Virusarten abzuweichen scheint; doch hat diese Aussage einstweilen natürlich nur den Wert einer Vermutung.

Ferner geht aus den Ergebnissen der Dilutionsreihe (Kaninchen 1 bis 7) hervor, daß einige Prämissen, auf welche *Bastai* und *Busacca* ihre Konzentrationsmethode basierten, in der Tat richtig sind. Die Abhängigkeit der Pathogenität eines Substrates von der Konzentration der in demselben enthaltenen Viruselemente konnte bestätigt werden. Es ist ferner klar, daß es gelingen müßte, eine an sich unwirksame Dilution schon durch eine geringfügige Konzentrationserhöhung pathogen zu machen, wenn die Konzentrationserhöhung ohne Schädigung der Viruselemente durchgeführt werden könnte. Rechnungsgemäß hätte z. B. die Einengung der 1600fachen Verdünnung *auf die Hälfte des Volums* zu diesem Ziele führen müssen. Nur erfüllt eben die Methode von *Bastai* und *Busacca* die Bedingung nicht, daß sie das Virus intakt läßt; es soll versucht werden, das Verfahren zu verbessern.

3. Denselben Effekt wie die bloße Verdünnung hatte *die Eindickung oder Eintrocknung der Virus-Liquor-Gemische* (Kaninchen Nr. 136, 142, 145 und Kaninchen II). Man darf daraus folgern, daß auch hier keine qualitative Änderung (Virulenzabnahme), sondern *eine rein quantitative Reduktion der infektionstüchtigen Keime im Spiele* ist, um so mehr als die Pathogenität des Ausgangsmateriales sofort wieder in Erscheinung tritt, wenn man von den schwach reagierenden Augen corneale Abimpfungen auf andere Kaninchen ausführt (Kaninchen 136b, 142b, IIb und Kaninchen 56 und 76). Für die Stärke der Reaktion ist eben die Zahl der **primär** infizierenden Keime maßgebend; diese reichern sich aber auch bei einer mild verlaufenden Erkrankung im Cornealgewebe und im Conjunctivalsekret an und eine auf dem Höhepunkte des Prozesses ausgeführte Übertragung mit solchem Material ruft wieder eine rasch einsetzende und heftige Keratoconjunctivitis hervor. Theoretisch bietet diese Auffassung keine Schwierigkeiten. Aus dem Studium des Bakterienwachstums auf Nährböden ist es bekannt, daß die initiale Phase der gehemmten Vermehrung („bacterial lag") um so länger dauert, je geringer die Zahl der verimpften Mikroben ist; die in unseren Versuchen beobachtete Verlängerung der Inkubation nach Verimpfung stark verdünnten oder getrockneten Herpesblaseninhaltes (keimarmen Mate-

riales) ist einfach als das Spiegelbild dieser Reagensglasphänomene im Organismus zu betrachten. Die bis auf 5 und 6 Tage angewachsene Latenzperiode ermöglicht ihrerseits die lokale Produktion von Antikörpern, die den weiteren Verlauf der verspätet einsetzenden Erkrankung abdämpfen müssen.

4. Stark verdünnte Virus-Liquor-Gemische bzw. Liquores, die Herpesvirus in geringer Konzentration enthalten, werden durch die Eintrocknung nach *Bastai* und *Busacca* völlig apathogen (vgl. die Kaninchen III, IV, V und VII mit den Kaninchen 3, 4, 5 und 7). Ein spärlicher Gehalt von Herpesvirus im Liquor läßt sich somit weit eher durch Verimpfung frischer als durch Übertragung abgedampfter Liquorproben nachweisen.

5. Unsere Versuche ergaben keine Anhaltspunkte, daß schwache, mild verlaufende herpetische Keratoconjunctividen keine Immunität gegen eine spätere corneale Reinfektion mit hochvirulentem Herpesmaterial hinterlassen (*Grüter*, *Bastai*, *Mariani*, *Greenbaum* und *Harkins*). Die Kaninchen Nr. 5, 7 und II, die sämtlich nur mit geringgradigen, rasch abheilenden Prozessen auf eine erste Infektion reagiert hatten, erwiesen sich gegen die nach 3 Wochen vorgenommene Reinfektion mit einem hochvirulenten und encephalitogenen Impfstoff ebenso völlig refraktär wie die Kaninchen Nr. 2, 3 und 4, bei denen die Erstinfektion von schweren bis schwersten Erscheinungen gefolgt war. Umgekehrt zeigten die Kaninchen Nr. 6, III, IV, V, VI und VII, welche das erste Mal normal geblieben waren, nach der Reinfektion nicht nur schwerste lokale Prozesse, sondern gingen sämtlich an keratogener Encephalitis ein; es war also nicht die Spur einer erhöhten Resistenz zu konstatieren. Wir sehen daher in der Immunitätsprobe mit *Doerr* ein verläßliches Kriterium für die Entscheidung, ob das geprüfte Auge vorher eine fortschreitende herpetische Infektion durchgemacht hat oder nicht.

6. Wenn der *Grüter*sche Cornealversuch mit irgendeinem Material (Blaseninhalt, Liquor, Blut, Blutserum, Organverreibung usw.) ein völlig negatives Resultat liefert, so beweist das noch nicht, daß in dem geprüften Substrat kein Herpesvirus vorhanden war; es könnte auch die Konzentration des Virus bzw. der Keimgehalt des Substrates unterschwellig oder das geimpfte Kaninchen zufällig individuell resistent gewesen sein. *So mußte beispielsweise die unwirksame Liquorverdünnung 1: 1600* (Kaninchen Nr. 6) *Herpesvirus enthalten haben*, da dieses in der daraus (mit besonderer Pipette!) hergestellten Verdünnung 1: 3200 (Kaninchen Nr. 7) nachweisbar war; wäre die Verdünnung 1: 3200 nicht geprüft worden, so hätte der negative Versuchsausfall bei Kaninchen Nr. 6 zu der irrigen Annahme verleiten können, daß die 1600fache Verdünnung keine Herpeskeime enthielt!

Der Umstand, daß das positive Ergebnis des *Grüter*schen Cornealversuches offensichtlich an eine bestimmte Minimalkonzentration des Herpesvirus in dem zur Verimpfung gelangenden Material gebunden ist und daß diese Minimalkonzentration möglicherweise noch von der Individualität des geimpften Kaninchens abhängt, vereitelte bisher auch unsere Bemühungen, intravenös injiziertes Herpesvirus im Blute von Versuchstieren kürzere oder längere Zeit nach der Einspritzung nachzuweisen und auf diese Art die Schicksale von zirkulierendem Herpesvirus zu verfolgen, Bemühungen, die an und für sich sowie im Hinblick auf die Theorie von *Bastai* und *Busacca* interessante Aufschlüsse versprachen.

So verdünnten wir einmal 0,02 ccm eines hochaktiven, wasserklaren Herpesblaseninhaltes mit 2 ccm normalem Liquors; die Verdünnung belief sich also auf 1 : 100. Das Gemenge wurde dem Kaninchen Nr. 355 (1900 g Körpergewicht) in die *linke* Ohrvene injiziert; das streng isolierte Tier zeigte 10 Tage nach der Injektion am rechten Auge einen transitorischen Reizzustand, am linken Auge dagegen entwickelte sich eine schwere Keratoconjunctivitis, deren herpetischer Charakter durch weitere Passagen und durch die Immunitätsprobe festgestellt werden konnte. Es war somit auf hämatogenem Wege eine typische Augenerkrankung entstanden; das Virus mußte im Blute zirkuliert haben, es konnte nur durch das Blut zu den Geweben der Bulbi gelangt sein.

20 Min., $6^1/_2$ und 36 Stunden nach der intravenösen Injektion wurden Blutproben aus der *rechten* Ohrvene entnommen und mit den frischen, noch ungeronnenen Blutproben die Kaninchen 356, 357 und 358 beidseits corneal infiziert. Bei keinem dieser Tiere zeigten sich auch nur die geringsten Andeutungen einer herpetischen Keratoconjunctivitis.

Veranschlagt man die gesamte Blutmenge des 1900 g schweren Kaninchens nur mit 100 ccm, so mußte das Virus in der Zirkulation eine weitere 50fache Verdünnung erfahren, so daß eine Totalverdünnung von 1 : 5000 resultierte, was nach unseren Erfahrungen mit einem anderen Herpesblaseninhalt (Patient B. D.) an sich genügt hätte, um den Nachweis des eingespritzten Infektionsstoffes unmöglich zu machen, selbst wenn keine Abwanderung der Keime aus der Blutbahn und keine humorale oder phagocytäre Abtötung derselben erfolgt wäre.

Offenbar muß man weit größere Mengen Herpesblaseninhalt (mindestens 0,5 ccm, vermutlich aber noch mehr) einspritzen, um das Hemmnis, das in der Verdünnung durch das strömende Blut notwendig gegeben ist, zu überwinden. So große Quantitäten vermochten wir uns aber noch nicht zu verschaffen und es wird wohl längere Zeit brauchen, bis wir (evtl. durch Materialentnahme bei mehreren Herpetikern und Vermengung der gewonnenen Blasenflüssigkeiten) zum Ziele kommen.

Beim Menschen, dessen Körperflüssigkeiten (Blut und Liquor) ein Volumen von einigen Litern repräsentieren, müßten die absoluten Mengen Infektionsstoff, die im Organismus gleichzeitig vorhanden sind, natürlich noch viel bedeutender sein, damit ein positiver Blut- und Liquorbefund mit Hilfe der cornealen Infektion des Kaninchens zustande kommen kann.

II.

Im Abschnitt I der vorliegenden Mitteilung konnte auf verschiedenen Wegen der experimentelle Beweis erbracht werden, daß positive Blut- und Liquorbefunde bei den diversen Formen der herpetischen Infektion eher zu erwarten sind, wenn man die Proben frisch auf die Cornea von Kaninchen überträgt, als wenn man sich der Konzentrationsmethode von *Bastai* und *Busacca* bedient, die statt der angestrebten Keimvermehrung eine sehr erhebliche Keimverminderung, wenn nicht gar eine völlige Abtötung des Herpesvirus zur Folge hat[1]).

In Anbetracht dieser Sachlage müssen die ausnahmslos negativen Untersuchungen von Blut und Liquor, wie sie in weit mehr als 200 Fällen durch Verimpfung von nativem Material von zahlreichen Autoren erzielt wurden, als vollwertiges Argument gegen die Richtigkeit der An-

[1]) Mit der Konzentrationsmethode haben außer *Bastai* und *Busacca* nur noch *Greenbaum* und *Harkins* (Arch. of dermatol. a. syphilol. **11**, H. 6. 1925) sowie *Teissier*, *Gastinel* und *Reilly* (Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **94**, H. 6. 1926.) gearbeitet. — *Greenbaum* und *Harkins* benützten als Ausgangsmaterial *nicht die Körperflüssigkeiten von Menschen, sondern von experimentell infizierten Kaninchen.* Der Liquor eines Kaninchens, der 5 Tage nach *cornealer Infektion* entnommen worden war, *wirkte frisch verimpft nicht auf die Kaninchencornea* (konform den negativen Resultaten, welche *Schnabel* bei einer größeren Zahl derartiger Untersuchungen erzielt hatte). *Greenbaum* und *Harkins* injizierten aber noch ein 2. Kaninchen *subcutan mit großen Dosen virulenter Kaninchenhirnemulsion*, und zwar im ganzen 6 mal mit 24stündigen Intervallen; 4 Tage nach der letzten Einspritzung wurde das Tier im agonalen Zustande aus der Carotis entblutet. *Das frische Blut* erwies sich als *avirulent*; im Vakuum über $CaCl_2$ ($1^1/_2$ Stunden bei Zimmertemperatur und dann noch 24 Stunden bei 38°) eingedickt, erzeugte es eine *schwere*, eingedickt und wieder mit NaCl-Lösung verdünnt eine *„milde" Keratoconjunctivitis.* Die Einengung betrug für das eingedickte Blut ca. das 12fache, für das eingedickte und wieder verdünnte etwa das 5fache (im Verhältnis zum ursprünglichen Blutvolum). Ein Beweis für den herpetischen Charakter der beobachteten Cornealprozesse wurde nicht versucht, Schutzmaßnahmen gegen Stallinfektionen werden nicht erwähnt; ebensowenig wurde geprüft, ob das Blut nicht bakteriell z. B. durch Erreger der Kaninchenseptikämie (*Rose*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **101**, 327. 1924) verunreinigt war. *Aus diesem einen Versuch kann daher überhaupt kein Schluß gezogen werden*, weder hinsichtlich der Brauchbarkeit der Eindickung zum Nachweis spärlicher Mengen von herpetischem Virus im Blute, noch auch in der Richtung daß die herpetische Erkrankung des Kaninchens eine generalisierte Infektion darstellt (*Greenbaum* und *Harkins*); abgesehen von den angeführten Einwänden, die sich gegen den angeblich positiven Blutbefund erheben lassen, kommt auch noch die eigentümliche Art in Betracht, in welcher das virushaltige Material dem blutspendenden Kaninchen einverleibt wurde (Überschwemmung des Organismus durch subcutan, möglicherweise auch intravenös eingespritzte Hirnemulsion). — *Teissier, Gastinel* und *Reilly* untersuchten *das Blut* von 8 Patienten (die zum Teil an floridem Herpes litten) und *den Liquor* von 14 Kranken mit spontanem oder provoziertem Herpes, wobei sie sich der Konzentrationsmethode von *Bastai* und *Busacca* bedienten; die Ergebnisse waren ausnahmslos negativ. Auch bei Individuen mit Herpes corneae oder bei mit Herpes behafteten Meningitispatienten war im Liquor nie Herpesvirus nachweisbar.

gaben von *Bastai* und *Busacca* anerkannt werden, um so mehr als sie sich zum großen Teile auf Patienten mit floridem Herpes beziehen, bei denen eine septikämische Verbreitung des Virus in den Körpersäften a priori wahrscheinlicher ist als nach dem Abklingen manifester Symptome[1]).

Wir haben es aber doch für zweckmäßig erachtet, nochmals von einer größeren Zahl von Herpeskranken und herpesfreien Menschen Blut und Liquor zu entnehmen und die gewonnen Proben teils in frischem (nativem) Zustande, teils nach vorheriger Einengung auf $^1/_{10}$ ihres Volums oder nach Eintrocknung im Vakuum auf ihren Gehalt an Herpesvirus im *Grüter*schen Cornealversuch unter Einhaltung aller erforderlichen Kautelen zu prüfen. In der Anwendung der als verfehlt erkannten Konzentrationsmethode lag eine gewisse Inkonsequenz; wir wollten aber einerseits jedem Einwand im voraus begegnen, andrerseits war es ja denkbar, daß der Vergleich der Resultate, die *mit demselben Material im nativen und im eingeengten Zustande* zu erzielen waren, weitere Aufschlüsse bieten würde. *Bastai* und *Busacca* haben solche Vergleiche, die als Prüfstein ihrer „Konzentrationstechnik" sehr wichtig gewesen wären, unterlassen, da sie a priori überzeugt waren, daß dabei eine relative Keimvermehrung (Anreicherung) zustande kommen müsse. (Vgl. nebenstehende Tabelle.)

Liquor- und Blutproben bzw. die aus den Blutproben abgeschiedenen Sera von insgesamt 43 Personen vermochten somit in keinem einzigen Falle auf der Cornea von Kaninchen eine typische Keratoconjunctivitis hervorzurufen. Bei einem geringen Bruchteil der geimpften Kaninchen (6 von 80 infizierten Tieren) persistierten die Impfstriche als feinste, mit freiem Auge schwer sichtbare, graue Linien durch einige Tage oder es trat eine geringgradige Rötung der Bindehaut auf, die nicht mit Eitersekretion verbunden war und nach kurzem Bestande zurückging; stets erfolgte eine rasche und komplette Ausheilung der genannten Veränderungen und es ließen sich weder Übertragungen auf andere Augen ausführen noch waren die betreffenden Corneae gegen eine spätere Inokulation von sicher virulentem Herpesmaterial total oder partiell immun. Es bestand somit kein Anhaltspunkt für einen positiven Versuchsausfall, um so weniger als derartige Befunde

[1]) *Bastai* und *Busacca* wollen sich sogar direkt überzeugt haben, daß das Herpesvirus im Blut und Liquor an Konzentration zunimmt, wenn man bei den betreffenden Individuen eine experimentelle Herpesinfektion (sei es an der Haut oder an der Cornea) erzeugt; der vorher avirulente oder schwach pathogene Liquor soll einige Zeit nach dem Eingriff stärker auf die Kaninchencornea gewirkt haben (l. c. S. 217 u. 222). Allerdings stehen auch diese Angaben in unlösbarem Widerspruch mit den eigenen Resultaten der genannten Autoren (Spärlichkeit der positiven Liquorbefunde bei Herpeskranken, Häufigkeit bei herpesfreien Personen) sowie vor allem mit den Ergebnissen anderer Untersucher.

Infektionszustand	Zahl der untersuchten Fälle	Untersuchtes Material	Resultat
Herpes labialis	2	frisches Blut	negativ
	1	frisches Serum	„
	6	frisches Blut	„
		frisches Serum	„
	1	frisches Serum	„
		eingedicktes Serum	„
Herpes corneae	1	frisches Blut	„
		frisches Serum	„
Herpesrekonvaleszenten	1	frisches Blut	„
	1	frisches Blut	„
		frisches Serum	„
	1	frisches Serum	„
		eingedicktes Serum	„
		eingetrocknetes Serum	„
	1	frischer Liquor	„
		eingetrockneter Liquor	„
Habituelle Herpetiker im Intervall	1	frisches Blut	„
	1	frischer Liquor	„
		eingetrockneter Liquor	„
Beliebige herpesfreie erwachsene Personen, zum Teil mit positiver Herpesanamnese	12	frischer Liquor	„
	9	frischer Liquor	„
		eingetrockneter Liquor	„
	5	eingetrockneter Liquor	„

in keiner der aufgezählten Kategorien (florider Herpes labialis, Herpes corneae, Herpesrekonvaleszenz, habitueller Herpes, herpesfreie Menschen) eine Häufung erkennen ließen und sich auf Blut-, Serum- und Liquoruntersuchungen verteilten. Das eingedickte oder eingetrocknete (nach *Bastai* und *Busacca* „konzentrierte") Material wirkte nie stärker auf die Cornea als dasselbe Material im frischen Zustande. Das Serum einer Patientin mit floridem Herpes labialis erzeugte sogar, frisch verimpft, nach 5 Tagen eine geringgradige Conjunctivitis, während 2 mit dem gleichen, aber eingeengten Serum infizierte Kaninchenaugen absolut reaktionslos blieben.

Auf Grund dieser, sowie früherer Erfahrungen können wir nur den einen Schluß ziehen, daß das gesetzmäßige Vorhandensein von Herpesvirus im Blute oder Liquor während einer manifesten herpetischen Erkrankung oder nach Ablauf derselben zwar in Anbetracht der Unvollkommenheit der Untersuchungsmethoden nicht sicher ausgeschlossen, aber mit eben diesen Methoden auch nicht bewiesen werden kann, daß also die Theorie von *Bastai* und *Busacca* über die endogene Ubiquität des Herpesvirus einstweilen als unbegründet zu betrachten ist.

Auf die Konsequenzen, dis sich hieraus für die Bewertung des Nachweises erheblicher Mengen von Herpesvirus im Liquor oder Gehirn von Encephalitispatienten ergeben, soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden.

Zusammenfassung.

1. Hochvirulenter Inhalt von Herpesblasen oder hochvirulentes Sekret herpetisch infizierter Kaninchenaugen büßen durch Eintrocknung auf Glas- oder Porzellanflächen ihre Pathogenität für die Kaninchencornea völlig ein. Zusatz der ca. 100fachen Menge menschlichen Blutserums vermag die virulicide Wirkung der Austrocknung nicht zu verhindern; Zusatz gleich großer Mengen von menschlichem Liquor cerebrospinalis dagegen schwächen den Effekt der Austrocknung merklich ab.

2. Verdünnt man wasserklaren, frischen Herpesblaseninhalt fortschreitend mit Liquor, so nimmt zunächst die Pathogenität mit steigender Verdünnung ab (Verlängerung der Inkubation, Abschwächung der Intensität und Verkürzung der Dauer der erzeugten Keratoconjunctivitiden), um schließlich jenseits einer mehr oder minder scharf ausgeprägten Verdünnungsgrenze ganz zu verschwinden. Was man als „Virulenz" eines virushaltigen Materiales zu bezeichnen und mit Hilfe des *Grüter*schen Cornealversuches zu messen pflegt, ist daher zum Teile eine Funktion des Gehaltes der untersuchten Probe an vermehrungsfähigen Viruselementen (der Viruskonzentration).

3. Es konnte gezeigt werden, daß die Eintrocknung oder Eindickung von in Liquor suspendiertem Herpesvirus ebenso auf die Pathogenität des letzteren einwirkt wie die bloße Verdünnung, daß also die Virulenzabnahme, welche durch Abdampfen solcher Flüssigkeiten erzielbar ist, mit größter Wahrscheinlichkeit auf eine rein quantitative Verminderung des Keimgehaltes bezogen werden darf.

4. Summieren sich Verdünnung und Eintrocknung, so wird die Pathogenitätsgrenze der Viruskonzentration um so früher unterschritten. Eine Liquorprobe, die im natürlichen Zustande das Virus in geringer, aber noch deutlich nachweisbarer Konzentration enthält, verliert daher ihre Pathogenität für die Kaninchencornea vollständig, wenn man sie eindampft oder eintrocknet.

5. Aus den sub 1—4 angeführten Tatsachen ergibt sich, daß die Konzentrationsmethode von *Bastai* und *Busacca* den Nachweis von Herpesvirus im Blutserum oder Liquor nicht erleichtert, sondern erheblich erschwert bzw. unmöglich macht. Die Prüfung von frischem Blut, Blutserum oder Liquor muß notwendigerweise bessere Resultate geben.

6. Mit dem Blut, Blutserum oder Liquor von 42 Personen (Herpeskranken, Herpesrekonvaleszenten, habituellen Herpetikern im Intervall und herpesfreien Erwachsenen) vermochten wir durch Verimpfung auf die Kaninchencornea in keinem Falle eine herpetische Keratoconjunctivitis hervorzurufen; auch jene leichten Verlaufsarten, die nach Impfungen mit stark verdünntem oder durch Austrocknung abgeschwäch-

tem Virus regelmäßig auftraten, waren nicht zu beobachten. Es war für den negativen Versuchsausfall gleichgültig, ob Serum oder Liquor im frischen oder eingeengten Zustande zur cornealen Probe verwendet wurden.

7. Das negative Ergebnis des *Grüter*schen Cornealversuches beweist nicht, daß das verimpfte Material kein Herpesvirus enthält; es kann ebensogut die Konzentration von tatsächlich vorhandenen Herpeselementen eine unterschwellige sein. Diese Annahme ließ sich durch Experimente über die Wirksamkeit hoher Virusverdünnungen und durch Versuche, intravenös injiziertes Herpesvirus im Blute (von Kaninchen) nachzuweisen, erhärten.

8. Für die Theorie von *Bastai* und *Busacca*, daß das Herpesvirus im Blut und Liquor nach Ablauf der manifesten Krankheitserscheinungen fortvegetiert, und für die aus dieser Theorie abgeleitete Erklärung des rezidivierenden, symptomatischen und provozierten Herpes fehlt vorläufig die Basis einer exakten Begründung. Es kann daher noch immer mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß der Herpesvirus kein belebter Mikroorganismus, sondern ein unbelebter, unter besonderen Umständen im Körper des Menschen neu entstehender Krankheitsstoff ist (*Doerr*).